

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- **BLANK PAGES**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

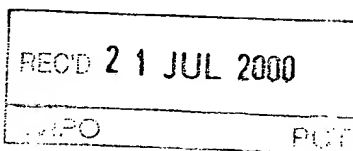
THIS PAGE BLANK (USPTO)



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE



Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 06 JUIN 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa
N° 55 -1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

21 MAI 1999

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 06494 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

XS

DATE DE DÉPÔT

21 MAI 1999

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

GROSSET-FOURNIER & DEMACHY SARL
20, rue de Maubeuge
75009 PARIS

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen



demande initiale

☒ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

IFB 99 CNR AMYL 01.42.81.09.58

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

GRAINS D'AMIDON CONTENANT UN POLYPEPTIDE RECOMBINANT D'INTERET, LEUR PROCEDE D'OBTENTION,
ET LEURS UTILISATIONS.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

C.N.R.S.

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Forme juridique

Nationalité (s) FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

3, rue Michel-Ange
75794 PARIS CEDEX 16

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

DEMACHY, Charles 422.5/PP170

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION : SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99/06494

TITRE DE L'INVENTION :

**GRAINS D'AMIDON CONTENANT UN POLYPEPTIDE RECOMBINANT D'INTERET,
LEUR PROCÉDE D'OBTENTION, ET LEURS UTILISATIONS**

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
3, rue Michel-Ange
75794 PARIS CEDEX 16
FRANCE**

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

**D'HULST, Christophe
81, rue Pierre Catteau
59150 WATTRELOS
FRANCE**

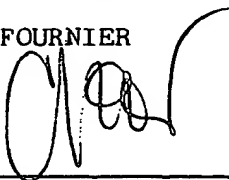
**BALL, Steven
58, rue Molhant
59830 BOURGHELLES
FRANCE**

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 4 octobre 1999

**Chantal GROSSET-FOURNIER
MANDATAIRE
422.5/PP112**



GRAINS D'AMIDON CONTENANT UN POLYPEPTIDE RECOMBINANT D'INTERÊT, LEUR PROCÉDE D'OBTENTION, ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention a pour objet des grains d'amidon contenant un polypeptide recombinant d'intérêt, leur procédé d'obtention, ainsi que leurs utilisations, notamment dans des compositions pharmaceutiques.

L'amidon représente l'une des sources les plus importantes de polysaccharides présents sur terre, et peut notamment être trouvé dans les plantes (maïs, pomme de terre, blé, riz, orge...), les algues, les microalgues etc. L'amidon se présente sous forme de grains insolubles dans l'eau, dont la taille peut varier de 0,1 à plusieurs dizaines de μm de diamètre selon l'origine (plantes, algues ou microalgues) ou encore le génotype du végétal considéré. Ainsi, les tailles de ces grains varient de 0,1 μm de diamètre à plus de 50 μm de diamètre. De même, les degrés de cristallinité de ces grains oscillent entre 0% (pour les grains riches en amylose) à plus de 30%. Il existe trois à quatre types cristallins (A, B, C, V). Le grain croît par apposition de couches successivement amorphes et semi-cristallines à partir du centre du grain d'amidon.

L'amidon renferme plusieurs fractions polysaccharidiques distinctes, composées de glucanes liés en α -1,4 et ramifiés en α -1,6. Plus particulièrement, l'amidon est constitué de deux polymères de glucose : l'amylose d'une part, fraction minoritaire du grain (environ 20 à 30 % en poids), de faible poids moléculaire, modérément ramifié (< 1 % de liaisons α -1,6) et l'amylopectine d'autre part, fraction majoritaire du grain (70 à 80 % en poids), de haut poids moléculaire et fortement ramifiée (5 % de liaisons α -1,6). L'amylose n'est pas nécessaire à l'édification de la cristallinité du grain d'amidon ; on sait aujourd'hui que c'est l'amylopectine qui est responsable de la cristallinité du grain d'amidon.

Au plan biologique, l'amidon *sensu stricto* n'est retrouvé que dans le règne végétal, et, plus spécifiquement, dans les chloroplastes ou dans les plastes non photosynthétiques de la cellule végétale eucaryote. Deux types d'amidon peuvent être synthétisés par les végétaux : l'amidon transitoire ou photosynthétique (dont la synthèse se déroule au niveau des chloroplastes), et, l'amidon de réserve (dont la synthèse se déroule au niveau des amyloplastes).

La synthèse de l'amidon chez les plantes fait intervenir toute une panoplie d'enzymes impliquées dans la biosynthèse du précurseur ADP-glucose, l'échafaudage des molécules d'amylose et d'amylopectine et enfin, la dégradation du grain d'amidon.

La première étape de la biosynthèse de l'amidon est la production du précurseur ADP-glucose qui fait intervenir deux enzymes : la phosphoglucomutase (PGM) et l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase).

La deuxième étape de la biosynthèse du grain d'amidon fait également intervenir deux types d'enzymes, principalement impliquées dans la synthèse de l'amylose et de l'amylopectine : les amidon-synthétases (ou adénosine diphosphate glucose α -1,4-glucane α -4-glucosyltransférases) et les enzymes de branchement (ou α -1,4-glucane-6-glucosyltransférases). Les amidon-synthétases catalysent le transfert du résidu de glucose de l'ADP-glucose sur des chaînes de glucanes en élongation en créant une liaison O-glycosidique de type α -1,4. Puis, les enzymes de branchement hydrolysent une liaison α -1,4 d'un glucane en élongation, et soudent ensuite le fragment ainsi libéré sur le reste du glucane par l'intermédiaire d'une liaison α -1,6.

En ce qui concerne la dégradation de l'amidon, il existe deux familles majeures d'enzymes de dégradation : les enzymes hydrolytiques (hydrolases) d'une part, telles que les α -amylases (endomylases), les β -amylases (exomylases), les γ -amylases (amyloglucosidases), les D-enzymes (glucosyltransférases), les R-enzymes (enzymes de débranchement), les α -glucosidases (maltases), et, d'autre part, les enzymes phosphorolytiques (ou amidon-phosphorylases).

Plusieurs isoformes d'amidon-synthétases coexistent chez les plantes supérieures. La distinction majeure entre ces isoformes tient en leur caractère soluble (à savoir qu'elles sont en solution dans le stroma plastidial des plantes) ou lié au grain d'amidon.

Les amidon-synthétases liées au grain d'amidon (ou GBSS pour Granule Bound Starch Synthases) sont retrouvées en étroite association avec l'amidon. Plusieurs isoformes de GBSS ont été isolées chez le maïs, le pois, la pomme de terre ou encore le blé (*MacDonald and Preiss, 1985 ; Smith, 1990 ; Dry et al., 1992 ; Denyer et al., 1995*). Dans tous les cas, c'est la GBSSI qui représente l'isoforme majeure ; le rôle tenu par cette isoforme dans la biogenèse du grain d'amidon est la formation

d'amylose (Tsai, 1974 ; Hovenkamp-Hermelink et al., 1987 ; Delrue et al., 1992 ; Denyer et al., 1995). Une mutation aux loci *WX* des céréales, *AMF* de la pomme de terre, *LAM* du pois, associe la disparition de la GBSSI à un effondrement total de la fraction amylosique de l'amidon. Un ADNc correspondant à la « protéine Waxy » (par abus de langage, on utilise le terme « protéine Waxy » pour désigner la GBSSI chez les plantes, la distinguant ainsi des autres GBSS) a été isolé chez le blé, l'orge, le maïs, le riz, la pomme de terre et le pois. Les comparaisons des séquences protéiques relatives montrent une homologie très grande entre les diverses espèces (Ainsworth et al., 1993).

La GBSSI n'est pas la seule amidon-synthétase liée au grain d'amidon. D'autres isoformes sont retrouvées liées au grain d'amidon chez le pois, la pomme de terre, le maïs ou encore le blé (Smith, 1990 ; Dry et al., 1992 ; Mu et al., 1994 ; Denyer et al., 1995). Cependant, les rôles tenus par chacune de ces isoformes ne sont pas clairs jusqu'à présent. De plus, la plupart d'entre elles sont aussi retrouvées dans la phase soluble.

Les amidon-synthétases solubles (ou SS pour Soluble Starch Synthases) ne sont pas liées au grain d'amidon, mais sont retrouvées sous forme soluble dans le stroma plastidial des plantes. De même que pour les formes liées, de multiples formes d'amidon-synthétases solubles sont présentes chez les végétaux supérieurs. Ainsi, on a par exemple pu détecter trois isoformes d'amidon-synthétases solubles (SSI, SSII et SSIII) dans le tubercule de pomme de terre.

Des ADNc correspondants aux différentes formes d'amidon-synthétases solubles ont été clonés chez les végétaux supérieurs (Baba et al., 1993 ; Dry et al., 1992 ; Edwards et al., 1995 ; Abel et al., 1996 ; Marshall et al., 1996 ; Gao et al., 1998). La comparaison des séquences qui en découle, montre clairement la présence de trois régions hautement conservées à travers les isoformes, que ce soit au sein d'une même espèce ou entre les espèces de plantes supérieures.

Des travaux de recherche récents menés par les Inventeurs ont permis d'établir que la l'amidon-synthétase soluble II (SSII) de *Chlamydomonas reinhardtii* est principalement impliquée dans la formation des cristaux de la molécule d'amylopectine.

En revanche, la GBSSI n'intervient pas dans l'édification des cristaux de l'amylopectine. L'activité GBSSI n'a jamais été détectée en phase soluble. La GBSSI est intimement associée au grain d'amidon. Cependant, contrairement à l'amylase, aucun motif de liaison à l'amidon n'a été mis en évidence dans les séquences de GBSSI décrites jusqu'à présent. Ainsi on ne connaît pas le mécanisme régissant la liaison de la GBSSI au granule d'amidon.

Les amidon-synthétases suscitent un intérêt particulier dans la mesure où ces enzymes pourraient permettre de véhiculer un peptide recombinant d'intérêt vers les plastides où a lieu la biosynthèse des grains d'amidon. Ainsi la transformation de plantes avec des séquences codant pour des peptides de fusion entre une amidon-synthétase et un peptide d'intérêt, permettrait d'obtenir des grains d'amidon en grande quantité à partir desquels ledit peptide d'intérêt pourrait être récupéré.

C'est dans cet objectif que les auteurs de la demande internationale WO 98/14601 (Exseed Genetics), ont décrit des séquences nucléotidiques codant des protéines de fusion dans lesquelles le polypeptide d'intérêt est lié à l'extrémité aminoterminal d'une amidon-synthétase choisie dans le groupe constitué par les amidon-synthétases solubles I, II et III (SSI, SSII, SSIII), les amidons-synthétases liées au grain (GBSS), les enzymes de branchement I, IIa et IIb et les glucoamylases. Toutefois aucun procédé de transformation de plantes à l'aide des séquences décrites dans cette demande, et donc d'obtention de grains d'amidon transformés par lesdites séquences, n'est illustré de façon détaillée.

La présente invention découle de la mise en évidence par les inventeurs du fait que seule la transformation de plantes avec des séquences nucléotidiques codant des polypeptides de fusion dans lesquels le polypeptide d'intérêt est lié à l'extrémité carboxyterminale de l'amidon-synthétase, permet d'obtenir des grains d'amidon contenant ledit peptide d'intérêt.

Un des buts de la présente invention est de fournir de nouvelles séquences nucléotidiques codant des protéines de fusion capables de véhiculer un peptide d'intérêt vers le site de biosynthèse des grains d'amidon dans les cellules végétales (y compris les cellules d'algues ou de micro-algues).

Un autre but de la présente invention est de fournir des plantes transformées à l'aide des séquences nucléotidiques susmentionnées, lesdites plantes produisant de l'amidon contenant un polypeptide d'intérêt.

Un autre but de la présente invention est de fournir des grains d'amidon contenant un polypeptide d'intérêt.

Un autre but de la présente invention est de fournir un procédé de préparation de ces grains d'amidon.

Un autre but de la présente invention est de fournir un procédé de préparation d'un polypeptide recombinant d'intérêt à partir de ces grains d'amidon.

Un autre but de la présente invention est de fournir, des compositions notamment alimentaires ou pharmaceutiques, contenant les grains d'amidon susmentionnés.

Un autre but de la présente invention est de fournir un procédé de biotransformation des grains d'amidon lorsque ledit peptide d'intérêt utilisé est capable de transformer l'amidon.

La présente invention a pour objet toute séquence nucléotidique recombinante caractérisée en ce qu'elle comprend, dans le sens 5'→3', une séquence nucléotidique codant pour une adénosine diphosphate glucose α -1,4-glucane α -4-glucosyltransférase ou amidon-synthétase (EC 2.4.1.21), ou pour une protéine dérivée de cette enzyme, notamment par suppression, addition ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ladite amidon-synthétase ou protéine dérivée ayant la propriété de migrer vers les sites de biosynthèse des grains d'amidon dans les cellules végétales et de s'associer aux grains d'amidon, ladite séquence nucléotidique codant pour l'enzyme ou protéine susmentionnée étant placée en amont d'une séquence nucléotidique codant pour un peptide ou polypeptide d'intérêt.

Par amidon-synthétase, on entend dans ce qui précède et ce qui suit, toute protéine ayant la propriété de migrer vers les sites de biosynthèse des grains d'amidon dans les cellules végétales et de s'associer aux grains d'amidon, que cette amidon-synthétase ait conservé ou non son activité enzymatique au sein du polypeptide de fusion, codé par une séquence nucléotidique recombinante susmentionnée, entre ladite amidon-synthétase et ledit polypeptide d'intérêt.

De préférence, la séquence nucléotidique codant pour une amidon-synthétase, ou pour une protéine dérivée telle que définie ci-dessus, est choisie parmi celles codant pour une amidon-synthétase liée au grain d'amidon GBSS présente notamment chez les plantes, algues ou micro-algues, et plus avantageusement encore pour une isoforme GBSSI, ou pour une protéine dérivée de cette GBSS, ou GBSSI, telle que définie ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique codant pour une amidon-synthétase, et plus particulièrement pour une GBSS, notamment pour une GBSSI, est telle qu'obtenue par criblage d'une banque d'ADNc préparée à partir de cellules susceptibles de contenir cette enzyme, notamment de cellules de plantes, algues ou micro-algues, à l'aide d'un antisérum contenant des anticorps reconnaissant spécifiquement ladite amidon-synthétase codée par un ou plusieurs ADNc de la banque, lorsque ladite amidon-synthétase est exprimée par un vecteur de clonage approprié, ledit antisérum étant obtenu par immunisation d'un animal, tel que le lapin, avec de l'amidon extrait des cellules susmentionnées.

L'invention concerne plus particulièrement toute séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique codant pour une amidon-synthétase, ou pour une protéine dérivée, est choisie parmi :

- la séquence nucléotidique de l'ADNc d'environ 2900 à 3100 paires de bases, et dont les 1696 paires de bases de l'extrémité 3' sont représentés sur la figure 1, ladite séquence nucléotidique :

- . codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* d'environ 640 à 680 acides aminés, notamment d'environ 660 acides aminés, dont l'extrémité aminoterminal correspond à l'enchaînement d'acides aminés suivant : ALDIVMVA AEVAPGGKTGGLGDV, et dont l'extrémité carboxyterminale correspond à l'enchaînement d'acides aminés représenté sur la figure 1,

- . et étant obtenue par criblage d'une banque d'ADNc préparée à partir de cellules de *Chlamydomonas reinhardtii*, à l'aide d'un antisérum obtenu par

immunisation de lapins avec de l'amidon extrait des cellules susmentionnées de *Chlamydomonas reinhardtii*,

- ou un fragment nucléotidique de l'ADNc susmentionné, codant pour un fragment peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*, ledit fragment peptidique comprenant l'intégralité de la partie aminoterminal de ladite GBSSI, et étant délimité à son extrémité carboxyterminale par l'acide aminé situé en l'une des positions 25 à 238, ou en l'une des positions 118 à 238, de la séquence en acides aminés représentée sur la figure 1,

- ou une séquence nucléotidique dérivée par dégénérescence du code génétique de la séquence nucléotidique de l'ADNc susmentionné, ou d'un fragment nucléotidique susmentionné de cette dernière, et codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* susmentionnée, ou pour un fragment peptidique susmentionné de cette dernière,

- ou une séquence nucléotidique dérivée d'une séquence ou d'un fragment nucléotidique susmentionnés, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, et codant une séquence peptidique dérivée de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* susmentionnée, ou dérivée d'un fragment peptidique susmentionné de cette dernière, et ayant la propriété de s'associer aux grains d'amidon, ladite séquence nucléotidique dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 50 %, et de préférence d'au moins environ 70 %, avec la séquence ou fragment nucléotidique susmentionnés,

- ou une séquence nucléotidique susceptible d'hybrider avec une des séquences ou fragments nucléotidiques susmentionnés, notamment dans les conditions stringentes d'hybridation définies ci-après,

la propriété que possède une amidon-synthétase, ou un fragment ou une protéine dérivée de cette dernière tels que définis ci-dessus, de pouvoir s'associer aux grains d'amidon, pouvant être mesurée selon la méthode suivante : extraction des protéines des grains d'amidon, par exemple selon le procédé détaillé ci-après, et détection de la présence de ladite amidon-synthétase, ou d'un fragment ou d'une protéine dérivée de cette dernière tels que définis ci-dessus, notamment par électrophorèse en gel de polyacrylamide selon la méthode détaillée ci-après.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique codant pour un peptide ou polypeptide d'intérêt est choisie parmi celles codant des peptides biologiquement actifs, notamment des peptides d'intérêt thérapeutique ou utilisables dans le domaine agroalimentaire.

L'invention concerne également toute séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique codant pour un peptide ou polypeptide d'intérêt est choisie parmi celles codant des enzymes susceptibles de transformer l'amidon, telles que les enzymes interagissant avec les α -glucanes dont les hydrolases diverses, les phosphorylases, les α -1,4 glucanotransférases, les enzymes de branchement, les amylases, et notamment les hydrolases thermostables issues de bactéries extrémophiles telles que les archaebactéries actives à des températures supérieures à 40 °C.

L'invention a également pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique codant pour un site de clivage, ladite séquence nucléotidique étant placée entre la séquence nucléotidique codant pour une amidon-synthétase, ou une protéine dérivée de cette dernière, et la séquence nucléotidique codant le polypeptide d'intérêt.

A titre d'illustration, la séquence nucléotidique codant pour un site de clivage est choisie parmi les séquences codant pour une séquence peptidique de type aspartyl-proline très labile en pH acide, ou codant pour une petite séquence peptidique reconnue spécifiquement par une protéase, telles que la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine, la collagénase, la thrombine, l'alsubtilisine, ou reconnue par des composés chimiques tel que le bromure de cyanogène.

L'invention a également pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend un promoteur situé en amont de la séquence nucléotidique codant pour une amidon-synthétase, ou une protéine dérivée de cette dernière, ainsi qu'une séquence codant pour des signaux de terminaison de la transcription située en aval de la séquence nucléotidique codant le polypeptide d'intérêt.

Parmi les promoteurs de transcription susceptibles de pouvoir être utilisés dans le cadre de la présente invention, on peut citer :

- pour les promoteurs procaryotes, les promoteurs Lac ou T7,
- pour les promoteurs eucaryotes de type végétaux supérieurs, le promoteur 35S CaMV, ou tout type de promoteur d'origine végétale,
- dans le cas de la transformation de microalgues, le promoteur utilisé peut être celui du gène *ARG7* codant l'arginosuccinate lyase ou encore le promoteur du gène *NIT1* codant la nitrate réductase.

L'invention a également pour objet tout vecteur recombinant, notamment du type plasmide, cosmide ou phage, caractérisé en ce qu'il contient une séquence nucléotidique recombinante selon l'invention telle que définie ci-dessus, insérée en un site non essentiel pour sa répllication.

L'invention concerne également tout hôte cellulaire, transformé par un vecteur récombinant tel que défini ci-dessus, notamment toute bactérie telle que *Agrobacterium tumefaciens*, et comprenant au moins une séquence nucléotidique recombinante selon l'invention.

L'invention concerne également tout polypeptide de fusion caractérisé en ce qu'il comprend :

- en position N-terminale une amidon-synthétase, ou une protéine dérivée de cette enzyme, notamment par suppression, addition ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ladite amidon-synthétase ou protéine dérivée ayant la propriété de migrer vers les sites de biosynthèse des grains d'amidon dans les cellules végétales et de s'associer aux grains d'amidon,

- et, en position C-terminale, un peptide ou polypeptide d'intérêt, la partie C-terminale de la séquence en acides aminés de l'amidon-synthétase, ou de la protéine dérivée, étant ainsi liée à la partie N-terminale de la séquence peptidique d'intérêt, ledit polypeptide de fusion étant codé par une séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus selon l'invention.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout polypeptide de fusion tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend en position N-terminale une GBSS présente notamment chez les plantes, algues ou micro-algues, et plus particulièrement

une isoforme GBSSI, ou une protéine dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement tout polypeptide de fusion tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que l'amidon-synthétase est choisie parmi :

- la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* d'environ 640 à 680 acides aminés, dont l'extrémité aminoterminal correspond à l'enchaînement d'acides aminés suivant: ALDIVMVA AEVAPGGKTGGLGDV, et l'extrémité carboxyterminale correspond à l'enchaînement d'acides aminés représenté sur la figure 1, ladite GBSSI étant codée par la séquence nucléotidique obtenue par criblage d'une banque d'ADNc préparée à partir de cellules de *Chlamydomonas reinhardtii*, à l'aide d'un antisérum obtenu par immunisation de lapins avec de l'amidon extrait des cellules susmentionnées de *Chlamydomonas reinhardtii*,

- ou un fragment peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*, ledit fragment peptidique comprenant l'intégralité de la partie aminoterminal de ladite GBSSI, et étant délimité à son extrémité carboxyterminale par l'acide aminé situé en l'une des positions 25 à 238, ou en l'une des positions 118 à 238, de la séquence en acides aminés représentée sur la figure 1,

- ou une séquence peptidique dérivée d'une séquence ou d'un fragment peptidique susmentionnés, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, et ayant la propriété de s'associer aux grains d'amidon, ladite séquence peptidique dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avantageusement d'au moins environ 80%, avec la séquence ou fragment peptidique susmentionnés,

la propriété que possède la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*, ou un fragment ou une protéine dérivée de cette dernière tels que définis ci-dessus, de pouvoir s'associer aux grains d'amidon, pouvant être mesurée selon la méthode décrite ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout polypeptide de fusion tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le polypeptide d'intérêt est choisi parmi les peptides biologiquement actifs, notamment les peptides d'intérêt thérapeutique ou utilisables dans le domaine agroalimentaire.

L'invention concerne également tout polypeptide de fusion tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le polypeptide d'intérêt est choisi parmi les enzymes susceptibles de transformer l'amidon, telles que les enzymes interagissant avec les α -glucanes dont les hydrolases diverses, les phosphorylases, les α -1,4 glucanotransférases, les enzymes de branchement, les amylases, et notamment les hydrolases thermostables issues de bactéries extrémophiles telles que les archaebactéries actives à des températures supérieures à 40 °C.

L'invention a également pour objet tout polypeptide de fusion tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend un site de clivage, tel que décrit ci-dessus, placé entre d'une part l'amidon-synthétase, ou une protéine dérivée de cette dernière, et, d'autre part, le polypeptide d'intérêt.

L'invention concerne également les cellules végétales transformées génétiquement, contenant une ou plusieurs séquences nucléotidiques recombinantes telles que décrites ci-dessus, intégrées dans leur génome ou maintenues de manière stable dans leur cytoplasme, lesdites cellules végétales étant choisies parmi les cellules de plantes, d'algues ou de micro-algues, capables de fabriquer de l'amidon.

L'invention vise également les cellules végétales transgéniques telles que décrites ci-dessus contenant un ou plusieurs polypeptides de fusion définis ci-dessus au sein des grains d'amidon contenus dans lesdites cellules végétales.

L'invention a plus particulièrement pour objet les cellules végétales transgéniques susmentionnées, transformées avec une séquence nucléotidique recombinante contenant la séquence nucléotidique de l'ADNc d'environ 2900 à 3100 paires de bases, et dont les 1696 paires de bases de l'extrémité 3' sont représentées sur la figure 1, ladite séquence nucléotidique codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* décrite ci-dessus, ou contenant un fragment ou une séquence dérivée tels que décrits ci-dessus de l'ADNc susmentionné.

L'invention a également pour objet les plantes, algues ou micro-algues transformées génétiquement, ou parties, notamment fleurs, fruits, feuilles, tiges, racines, semences, ou fragments de ces plantes, algues ou micro-algues, comprenant au moins une séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus intégrée dans le génome ou maintenue de manière stable dans le cytoplasme des cellules les composant.

L'invention vise également les plantes, algues ou micro-algues transformées génétiquement, ou parties, ou fragments de ces plantes, algues ou micro-algues, tels que définis ci-dessus, contenant un ou plusieurs polypeptides de fusion tels que décrits ci-dessus au sein des grains d'amidon contenus dans les cellules végétales les composant.

Parmi les plantes, algues ou micro-algues transformées dans le cadre de la présente invention, on peut citer principalement le blé, le maïs, la pomme de terre, le riz, l'orge, l'amarante, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*.

L'invention a plus particulièrement pour objet les plantes, algues ou micro-algues transgéniques susmentionnées, transformées avec une séquence nucléotidique recombinante contenant la séquence nucléotidique de l'ADNc d'environ 2900 à 3100 paires de bases, et dont les 1696 paires de bases de l'extrémité 3' sont représentées sur la figure 1, ladite séquence nucléotidique codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* décrite ci-dessus, ou contenant un fragment ou une séquence dérivée tels que décrits ci-dessus de l'ADNc susmentionné.

L'invention concerne également les grains d'amidon caractérisés en ce qu'ils comprennent un ou plusieurs polypeptides de fusion définis ci-dessus, lesdits grains d'amidon étant encore désignés par l'expression "grains d'amidon transformés" ou "glucosomes".

L'invention a plus particulièrement pour objet les grains d'amidon susmentionnés comprenant un polypeptide de fusion défini ci-dessus, ledit polypeptide de fusion contenant la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* d'environ 640 à 680 acides aminés décrite ci-dessus, dont l'extrémité aminoterminal correspond à l'enchaînement d'acides aminés suivant : ALDIVMVAAEVAPGGKTGGLGDV, et l'extrémité carboxyterminale correspond à l'enchaînement d'acides aminés représenté sur la figure 1, ou un fragment ou un polypeptide dérivé tels que décrits ci-dessus de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Avantageusement, les grains d'amidon susmentionnés sont caractérisés en ce qu'ils ont un diamètre compris entre environ 0,1 μm et quelques dizaines de μm , et en ce que la proportion en poids des polypeptides de fusion dans ces grains est comprise entre environ 0,1 % et 1 %.

L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend des grains d'amidon transformés tels que définis ci-dessus, le cas échéant en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, lesdits grains contenant un ou plusieurs polypeptides de fusion tels que définis ci-dessus, le peptide d'intérêt dans lesdits polypeptides de fusion possédant un effet thérapeutique déterminé.

Avantageusement les compositions pharmaceutiques susmentionnées de l'invention se présentent sous une forme administrable par voie parentérale, notamment par voie intraveineuse, ou sous une forme administrable par voie orale.

De préférence, les compositions pharmaceutiques susmentionnées administrables par voie parentérale, sont caractérisées en ce que le diamètre des grains d'amidon est compris entre environ 0,1 μm et plusieurs μm , notamment entre environ 0,1 μm et 10 μm , et en ce que la proportion en poids des polypeptides de fusion dans ces grains est comprise entre environ 0,1 % et 1 %.

Des grains d'amidon tels que décrits ci-dessus dont les faibles diamètres sont compris entre environ 0,1 μm et environ 10 μm , et dans lesquels la proportion en poids des polypeptides de fusion est comprise entre environ 0,1 % et 1 %, sont avantageusement obtenus :

- à partir de plantes ou cellules de plantes transformées dans le cadre de la présente invention et choisies pour leur propriété à produire naturellement les grains d'amidon susmentionnés, lesdites plantes étant choisies notamment parmi le riz, l'amarante,

- ou à partir de parties de plantes transformées dans le cadre de la présente invention, lesdites parties de ces plantes produisant naturellement les grains d'amidon susmentionnés, telles que les feuilles des plantes,

- ou à partir de plantes ou cellules de plantes transformées dans le cadre de la présente invention, ces plantes étant choisies parmi des plantes comportant des mutations telles qu'elles produisent des grains d'amidon de faibles diamètres susmentionnés, notamment à partir des plantes mutantes décrites dans Buléon A. et al., 1998,

- ou à partir de plantes ou cellules de plantes transformées dans le cadre de la présente invention, ces plantes étant choisies parmi des plantes transformées à l'aide

de séquences nucléotidiques antisens de tout ou partie du gène codant pour l'ADP-glucose pyrophosphorylase nécessaire à la synthèse d'ADP-glucose dans les cellules végétales, notamment à partir des plantes transformées décrites dans l'article de Müller-Röber B. et al., 1992.

Avantageusement, dans le cas de compositions pharmaceutiques susmentionnées administrables par voie parentérale, les grains d'amidon sont de préférence choisis parmi ceux de structure amorphe dans le cas où l'on souhaite obtenir une libération rapide du polypeptide de fusion qu'ils contiennent dans le sang du patient, ou, au contraire parmi ceux de structure cristalline lorsque l'on souhaite libérer progressivement le polypeptide de fusion dans le sang.

A titre d'illustration, des grains d'amidon amorphes peuvent être obtenus à partir de semences transformées selon l'invention en phase de germination, ou à partir de plantes mutantes particulières telles que décrites par Shannon J. et Garwood D., 1984, notamment à partir des cultivars mutants tels que "amylose extender" du maïs ou encore tous les cultivars mutants de plantes, algues ou micro-algues dont l'amidon est enrichi en amylose.

Les grains d'amidon selon l'invention de structure cristalline, présentent avantageusement environ 30 à 35% de cristaux, et peuvent être obtenus à partir de semences de plantes, notamment de céréales, venant d'être récoltées et à maturité, ou à partir de plantes mutantes telles que décrites par Shannon J. et Garwood D., 1984, notamment à partir des cultivars mutants tels que "waxy" du maïs ou encore tous les cultivars mutants de plantes, algues ou micro-algues dont l'amidon est dépourvu d'amylose.

L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs polypeptides de fusion tels que définis ci-dessus, le cas échéant en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, le peptide d'intérêt dans lesdits polypeptides de fusion possédant un effet thérapeutique déterminé.

L'invention concerne également toute composition alimentaire caractérisée en ce qu'elle comprend des grains d'amidon transformés tels que définis ci-dessus, lesdits grains contenant un ou plusieurs polypeptides de fusion tels que définis ci-dessus, le

peptide d'intérêt dans lesdits polypeptides de fusion étant utilisable dans le domaine agroalimentaire.

L'invention a également pour objet toute composition alimentaire telle que décrite ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs polypeptides de fusion tels que définis ci-dessus, le peptide d'intérêt dans lesdits polypeptides de fusion étant utilisable dans le domaine agroalimentaire.

La présente invention concerne également tout procédé d'obtention de cellules végétales (de plantes, algues ou micro-algues), et, le cas échéant de plantes, algues ou micro-algues entières, transformées par au moins une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la transformation de cellules végétales, de manière à intégrer dans le génome de ces cellules, ou à maintenir de manière stable dans leur cytoplasme, une ou plusieurs séquences nucléotidiques recombinantes selon l'invention, et mise en culture *in vitro* de ces cellules transformées,
- le cas échéant, l'obtention de plantes transformées à partir des cellules transformées susmentionnées.

Selon un mode de réalisation du procédé susmentionné de l'invention, la transformation de cellules végétales peut être réalisée par transfert de la séquence nucléotidique recombinante de l'invention dans les protoplastes, notamment après incubation de ces derniers dans une solution de polyéthylène glycol (PEG) en présence de cations divalents (Ca^{2+}) selon la méthode décrite dans l'article de Krens *et al.*, 1982.

La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par électroporation notamment selon la méthode décrite dans l'article de Fromm *et al.*, 1986.

La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par utilisation d'un canon à gène permettant la projection, à très grande vitesse, de particules métalliques recouvertes de séquences nucléotidiques recombinantes selon l'invention, délivrant ainsi des gènes à l'intérieur du noyau cellulaire, notamment selon la technique décrite dans l'article de Sanford, 1988.

Une autre méthode de transformation des cellules végétales, est celle de la micro-injection cytoplasmique ou nucléaire telle que décrite dans l'article de De La Penna *et al.*, 1987.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré du procédé susmentionné de l'invention, les cellules végétales sont transformées par mise en présence de ces dernières avec un hôte cellulaire transformé par un vecteur selon l'invention, tel que décrit ci-dessus, ledit hôte cellulaire étant susceptible d'infecter lesdites cellules végétales en permettant l'intégration dans le génome ou le maintien de manière stable dans le cytoplasme de ces dernières, des séquences nucléotidiques recombinantes de l'invention initialement contenues dans le génome du vecteur susmentionné.

Avantageusement, l'hôte cellulaire susmentionné utilisé est *Agrobacterium tumefaciens*, notamment selon les méthodes décrites dans les articles de Bevan, 1984 et d'An *et al.*, 1986, ou encore *Agrobacterium rhizogenes*, notamment selon la méthode décrite dans l'article de Jouanin *et al.*, 1987.

Parmi les cellules végétales susceptibles d'être transformées dans le cadre de la présente invention, on peut citer principalement les cellules de blé, maïs, pomme de terre, riz, orge, amarante, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chorella vulgaris*.

Selon un mode de réalisation du procédé susmentionné de l'invention, les cellules végétales transformées selon l'invention, sont cultivées *in vitro*, notamment en bioréacteurs selon la méthode décrite dans l'article de Brodelius, 1988, en milieu liquide, ou selon la méthode décrite dans l'article de Brodelius *et al.*, 1979, sous forme immobilisées, ou encore selon la méthode décrite dans l'article de Deno *et al.*, 1987, procédant par culture de racines transformées *in vitro*.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé susmentionné de l'invention, la transformation de cellules végétales est suivie par une étape d'obtention de plantes transformées par mise en culture desdites cellules transformées dans un milieu approprié, et, le cas échéant, fécondation et récupération des semences des plantes obtenues à l'étape précédente, et mise en culture de ces semences pour l'obtention de plantes de génération suivante.

Les semences transformées selon l'invention sont récoltées à partir de plantes transformées susmentionnées, ces plantes étant soit celles de la génération T0, à savoir celles obtenues à partir de culture de cellules transformées de l'invention sur un milieu approprié, soit avantageusement celles des générations suivantes (T1, T2 etc.) obtenues par autofécondation des plantes de la génération précédente et dans lesquelles les séquences nucléotidiques recombinantes de l'invention se reproduisent selon les lois de Mendel, ou les lois de l'hérédité extrachromosomique.

L'invention concerne également un procédé de préparation de grains d'amidon transformés tels que décrits ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'extraction des grains d'amidon à partir de cellules végétales transformées ou de plantes, ou de parties, notamment fleurs, fruits, feuilles, tiges, racines, ou de fragments de ces plantes, transformées susmentionnées, notamment par sédimentation dans les conditions décrites ci-après.

De préférence, les grains d'amidon selon l'invention sont tels qu'obtenus par extraction à partir de plantes, algues ou micro-algues, transformées décrites ci-dessus, ou à partir de parties, ou de fragments de ces plantes, algues ou micro-algues, définies ci-dessus, notamment par sédimentation dans les conditions décrites ci-après.

Les plantes transformées utilisées pour la récupération des grains d'amidon sont celles de la génération T0, ou avantageusement celles des générations suivantes (T1, T2 etc.) susmentionnées.

L'invention concerne également un procédé de préparation de polypeptides de fusion tels que définis ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de récupération, et le cas échéant de purification, des polypeptides de fusion à partir des grains d'amidon transformés susmentionnés, notamment dans les conditions décrites ci-après.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un peptide d'intérêt caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre d'un procédé tel que décrit ci-dessus d'obtention de cellules végétales ou de plantes transformées selon l'invention, ledit procédé étant effectué par transformation de cellules végétales avec des séquences nucléotidiques susmentionnées codant pour un polypeptide de fusion contenant un site de clivage tel que décrit ci-dessus, et comprend une étape supplémentaire de clivage dudit polypeptide de fusion, à l'aide d'un réactif approprié, puis, le cas échéant, une étape de purification du polypeptide d'intérêt.

L'invention concerne également un procédé de biotransformation de grains d'amidon caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- transformation de cellules végétales telles que définies ci-dessus à l'aide de cellules hôtes décrites ci-dessus contenant une ou plusieurs séquences nucléotidiques codant pour des enzymes susceptibles de transformer l'amidon susmentionnées,

- obtention de plantes, algues ou micro-algues transformées de manière à ce que leur génome contienne une ou plusieurs séquences nucléotidiques décrites ci-dessus, par culture *in vitro* des cellules végétales transformées susmentionnées,

- le cas échéant, fécondation et récupération des semences des plantes obtenues à l'étape précédente, et mise en culture de ces semences pour l'obtention de plantes de génération suivante,

- extraction des grains d'amidon à partir des plantes, algues ou micro-algues, ou de parties, notamment fleurs, fruits, feuilles, tiges, racines, ou de fragments de ces plantes, algues ou micro-algues transformées susmentionnées, notamment par sédimentation dans les conditions décrites ci-après,

- le cas échéant, chauffage desdits grains d'amidon à une température à laquelle le peptide d'intérêt du polypeptide de fusion susmentionné est susceptible d'être actif.

De préférence, lorsque les procédés décrits ci-dessus sont réalisés par transformation de cellules de plantes, ces dernières sont transformées avec des séquences recombinantes susmentionnées contenant la séquence nucléotidique de l'ADNc d'environ 2900 à 3100 paires de bases, et dont les 1696 paires de bases de l'extrémité 3' sont représentées sur la figure 1, ladite séquence nucléotidique codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* décrite ci-dessus, ou contenant un fragment ou une séquence dérivée tels que décrits ci-dessus de l'ADNc susmentionné. L'utilisation de telles séquences recombinantes contenant la séquence nucléotidique codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* décrite ci-dessus, permet avantageusement d'éviter l'apparition de phénomènes de co-suppression chez les plantes transformées ainsi obtenues.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'anticorps reconnaissant spécifiquement une amidon synthétase liée au grain d'amidon, d'une plante, algue ou micro-algue déterminée, par immunisation d'un animal, notamment d'un lapin, avec de l'amidon provenant de ladite plante, algue ou micro-algue.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de préparation d'anticorps reconnaissant spécifiquement la GBSSI, d'une plante, algue ou micro-algue déterminée, par immunisation d'un animal, notamment d'un lapin, avec de l'amidon provenant de ladite plante, algue ou micro-algue.

L'invention a plus particulièrement pour objet encore un procédé de préparation d'anticorps reconnaissant spécifiquement une isoforme de GBSS autre que la GBSSI, d'une plante, algue ou micro-algue déterminée, par immunisation d'un animal, notamment d'un lapin, avec de l'amidon provenant de ladite plante, algue ou micro-algue comportant une mutation telle que l'expression de la GBSSI est réprimée, par exemple une mutation choisie parmi les suivantes : *sta2-29::ARG7* chez *Chlamydomonas reinhardtii* (décrite par Delrue *et al.*, 1992, susmentionné), *amf* chez la pomme de terre (décrite par Hovenkamp-Hermelink *et al.*, 1987, susmentionné), *wx* chez le maïs, le riz et le blé (décrite par Tsai., 1974, susmentionné), *lam* chez le pois (décrite par Denyer *et al.*, 1995, susmentionné).

L'invention a également pour objet un procédé d'obtention de l'amidon synthétase, telle que la GBSS, et plus particulièrement pour l'isoforme GBSSI, d'une plante, algue ou micro-algue déterminée, par criblage d'une banque d'ADNc préparée à partir de cellules de ladite plante, algue ou micro-algue déterminée, susceptibles de contenir cette enzyme, à l'aide d'un antisérum contenant des anticorps reconnaissant spécifiquement ladite enzyme codée par un ou plusieurs ADNc de la banque, lorsque ladite enzyme est exprimée par un vecteur de clonage approprié, ledit antisérum étant obtenu selon le procédé susmentionné.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit du clonage du gène codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*, et de l'obtention de grains d'amidon transformés contenant un polypeptide de fusion avec ladite GBSSI, ainsi qu'à l'aide de la figure 1 représentant la séquence nucléotidique et la séquence protéique déduite de l'insert ADNc du clone CD142 codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*. (la séquence soulignée correspond à une des trois régions hautement conservées à travers toutes les amidon- et glycogène- synthétases et intervient probablement dans la fixation du substrat ADP-glucose).

I) Clonage des séquences d'ADNc (ADN complémentaire) et d'ADNg (ADN génomique) correspondant au gène de structure de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*.

A) Clonage de l'ADNc

La stratégie développée afin de cloner l'ADNc correspondant au gène de structure de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* fait appel au criblage d'une banque d'expression à l'aide d'un antisérum polyclonal. L'antisérum est capable de reconnaître une séquence polypeptidique codée par un ADNc exprimé depuis un vecteur de clonage adéquat.

a) Production de l'antisérum

Afin de produire un antisérum susceptible de reconnaître spécifiquement la GBSSI de *C. reinhardtii*, l'amidon provenant de la souche sauvage (137C) a été injecté à trois reprises à un lapin hybride néo-zélandais albinos. Lors d'une expérience similaire, c'est l'amidon résiduel d'une souche double mutante aux loci *STA2* et *STA3* (IJ2) qui a été injecté au lapin dans les mêmes conditions.

Protocoles détaillés :

- Génotypes des souches de *C. reinhardtii* :

137C : *mt-nit1 nit2*

IJ2 : *mt-nit1 nit2 sta2-29::ARG7 sta3-1*

La souche 137C constitue la souche de référence pour toutes les études du métabolisme de l'amidon effectuées chez *C. reinhardtii*. La souche IJ2 a été entièrement décrite par Maddelein et coll. en 1994. Dans cette souche double mutante aux loci *STA2* et *STA3*, les activités GBSSI et SSII sont simultanément absentes. La mutation au locus *STA2* a été générée par interruption génique à l'aide du plasmide pARG7 (Maddelein et coll., 1994) et conduit à la disparition totale de la GBSSI du grain d'amidon, alors que l'allèle mutant du gène *STA3* a été engendré par mutagenèse aux rayons X (Fontaine et coll., 1993).

- Conditions de culture, extraction et purification de l'amidon : les cellules sont mises en culture pendant 3 jours dans le milieu TAP en lumière continue (3000 lux) à partir d'un inoculum de 5×10^4 cellules/ml. La culture principale est stoppée alors que la concentration cellulaire atteint environ 2×10^6 cellules/ml.

Composition du milieu TAP (valeurs pour un litre de milieu) :

NH ₄ Cl.....	0,40 g	ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	22 mg
Tris.....	2,40 g	H ₃ BO ₃	11,4 mg
KH ₂ PO ₄	0,32 g	MnCl ₂ .4H ₂ O.....	5,1 mg
K ₂ HPO ₄	1,47 g	FeSO ₄ .7H ₂ O.....	4,2 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,05 g	MoO ₃	1,8 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,30 g	CoCl ₂ .6H ₂ O.....	1,6 mg
EDTA.....	50 mg	CuO ₄ .5H ₂ O.....	1,6 mg

Le pH du milieu est ajusté à 7 par de l'acide acétique glacial

Le milieu TAP-N présente la même composition de base, mais ce milieu se distingue du premier par l'absence d'azote apporté sous forme de chlorure d'ammonium, remplacé par le chlorure de sodium à la même concentration ; c'est dans ces conditions de culture que les cellules accumulent une quantité d'amidon représentant jusqu'à vingt fois celle de cellules cultivées en milieu TAP. Dans ce cas, la culture est menée pendant 5 jours en lumière continue à partir d'une culture inoculée à 5×10^5 cellules/ml.

Les cellules sont ensuite concentrées par centrifugation à $2-4 \times 10^8$ cellules/ml (tampon Tris/acétate pH 7,5 50 mM ; EDTA 10 mM ; DTT 2,5 mM) puis soumises à l'action de la presse de French à 10000 psi. L'extrait obtenu en sortie de presse est centrifugé à 5000 g pendant 15 min à 4°C. Le culot qui contient l'amidon est remis en suspension dans un volume d'eau, auquel sont rajoutés neuf volumes de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suède) avant d'être centrifugé à 10000 g pendant 30 min à 4°C. Le Percoll forme un gradient de densité lors de la centrifugation. L'amidon qui est très dense (sa densité est de 1,3 à 1,5) sédimente au fond du tube alors que les lipides et autres débris cellulaires de faible densité forment une « capsule » à la surface du gradient de Percoll. Le culot d'amidon est ensuite rincé trois fois par de l'eau

désionisée puis conservé à 4°C après l'avoir débarrassé du dernier surnageant de rinçage.

- Conditions d'immunisation du lapin, prélèvement et préparation de l'antisérum : le lapin utilisé lors de cette expérience est un lapin hybride néo-zélandais albinos. Trois injections successives espacées de trois semaines ont été effectuées avec 20 mg d'amidon purifié en suspension dans 500 µl d'eau. A cette suspension, sont rajoutés 500 µl de l'adjuvant de Freud standard. Le sang du lapin a été prélevé 3 semaines après l'ultime injection. Le sérum est préparé par simple centrifugation du sang après 24 heures de coagulation à 4°C. Les antiséras générés par les injections des amidons des souches 137C et IJ2 sont identifiés par les dénominations « antisérum SA137C » et « antisérum SAIJ2 » respectivement dans ce qui suit.

b) Préparation et criblage de la banque d'ADNc

La banque d'ADNc a été produite à partir des ARNm purifiés de la souche sauvage de *C. reinhardtii*. C'est le vecteur d'expression λ ZAP qui a été utilisé

Protocoles détaillés :

- Préparation des ARN totaux de *C. reinhardtii* : cette méthode est une adaptation de celle utilisée pour extraire les ARN des feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Les cellules d'une culture de $1-2 \times 10^6$ cellules/ml sont récoltées par centrifugation à 3500 g pendant 15 min à 4°C. Les cellules sont ensuite réparties en aliquotes d'un volume d'environ 200 µl. A ce stade, les cellules sont congelées dans l'azote liquide et peuvent être conservées à -80°C pour plusieurs mois. A ces 200 µl de cellules congelées sont ajoutés 400 µl du tampon « Z6 » de composition suivante :

Tampon Z6 :	MES/NaOH pH 7,0	20 mM
	EDTA	20 mM
	Guanidine-HCl	6 M
	β-mercaptoéthanol	100 µM.

Le mélange est très fortement agité pendant plusieurs minutes, puis 400 µl du mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25v/24v/1v) sont additionnés et le mélange est de nouveau fortement agité pendant plusieurs minutes. Le tout est centrifugé à 13000 g pendant 10 min à 4°C. Après avoir récupéré puis estimé le

volume du surnageant, on y ajoute 1/20 de volume d'acide acétique à 1 M ainsi que 0,7 volumes d'éthanol 100%. On laisse le temps aux acides nucléiques de précipiter à -20°C pendant au moins 30 min. Après centrifugation à 13000 g pendant 15 min à 4°C, le culot est resuspendu dans 400 µl d'acétate de sodium à 3 M pH 5,6 puis centrifugé 10 min à 13000 g à 4°C. Le culot est alors rincé deux fois avec de l'éthanol à 70%, séché et enfin dissout dans 50 µl d'eau traitée au DEPC. La quantité d'acides nucléiques est estimée au spectrophotomètre à 260 nm ($DO_{260}=1$ équivaut à environ 40 µg/ml d'acides nucléiques).

- Construction d'une banque d'ADNc dans le vecteur λ ZAP : les ARN dotés d'une queue polyA (les ARNm en particulier) sont isolés de la préparation d'ARN totaux grâce au kit « polyATtract mRNA isolation systems » commercialisé par Promega (Madison, WI, USA). La synthèse des ADNc, la ligation dans le vecteur ZAP et l'empaquetage dans les capsides sont effectués avec l'aide du kit « cDNA synthesis kit, ZAP-cDNA synthesis kit and ZAP-cDNA gigapack II gold cloning kit » commercialisé par Stratagene (La Jolla, CA, USA). Le protocole suivi correspond au manuel d'instruction fourni avec le kit.

- Criblage immunologique d'une banque d'ADNc dans un vecteur d'expression : le criblage de la banque d'expression d'ADNc λ ZAP de *C. reinhardtii* a été réalisé par l'utilisation de l'antisérum préalablement obtenu (voir supra). Environ 100000 plaques de lyse sont étalées par la technique du Top-agar sur plusieurs boîtes de pétri contenant du milieu de croissance bactérien et l'antibiotique adapté. Après 3 heures d'incubation à 37°C, des filtres de nitrocellulose (Protan BA 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne) préalablement plongés dans une solution d'IPTG 10 mM et séchés, sont appliqués à la surface du Top-agar. Les boîtes sont à nouveau incubées pendant 3 heures à 37°C avant d'être placées 30 min à 4°C. Les filtres de nitrocellulose sont alors délicatement retirés de la surface gélosée. Lors du criblage de la banque λZAP c'est la souche d'*E. coli* XL1-blue qui a été utilisée. Le protocole de révélation des filtres est alors le même que celui utilisé lors de l'étude en Western Blot (voir le chapitre concernant le Western Blot).

Les plages de lyse positives sont soumises à deux séries successives de criblage par le même antisérum afin de confirmer leur caractère positif, mais aussi pour les purifier. Lorsqu'une plage de lyse se révèle positive à la fin des trois tours de

criblage, la séquence du plasmide pBluescript SK+ contenant l'insert d'intérêt est excisée du phage λ *in vivo*. C'est le phage « ExAssist helper phage » qui est utilisé pour la cotransfection de la souche SOLR avec le phage λ ZAP. On obtient ainsi un phagemide qui est utilisé pour l'infection de la souche XL1-Blue MRF' conduisant à la restitution du plasmide double brin pBluescript SK+ porteur de l'ADNc d'intérêt.

Un tel criblage mené avec l'antisérum SA137C a conduit à l'obtention d'un unique clone positif après trois tours de criblage. Nous avons dénommé ce clone par « CD142 ». L'insert du clone CD142 possède une taille de 1696 pb (voir la séquence sur la figure 1).

c) Analyse de la séquence de l'insert du clone CD142

Lorsqu'on interroge les banques de séquences protéiques avec celle déduite du clone d'ADNc « CD142 », les similitudes les plus importantes sont obtenues avec les GBSSI des plantes supérieures. Cette première indication sur l'origine de cet ADNc est renforcée par la présence d'une extension de 119 aminoacides (environ 14 kDa) en position carboxy-terminale de la séquence codante, par rapport aux principales GBSSI des plantes supérieures. En effet, le poids moléculaire de la GBSSI de *C. reinhardtii*, estimé par SDS-PAGE, est en moyenne de 10 à 15 kDa supérieur à ceux des protéines correspondantes chez les végétaux. L'extension de 119 aminoacides pourrait expliquer cette différence de poids moléculaire entre les GBSSI d'origines différentes. Prise séparément, cette extension de la séquence codante ne partage aucune similitude avec d'autres types de séquences polypeptidiques déjà connues.

La présence du codon stop UAA en position 717 signale le début d'une très longue région non codante de 946 pb. Très fréquentes dans les gènes nucléaires de *Chlamydomonas*, ces régions non codantes en position 3' terminale, semblent être surtout destinées à stabiliser le messager.

B) Clonage de l'ADNg

L'ADNg relatif au clone CD142 a été isolé après criblage d'une banque indexée d'ADNg dans des cosmides (Zhang et coll., 1994). Construite dans un vecteur cosmidique dérivé de c2RB, cette banque d'ADNg est contenue dans 120 plaques de microtitration de 96 puits. Chaque puits (sauf deux afin de faciliter l'orientation de la

plaque) contient un clone bactérien transportant un unique cosmide. L'ensemble de la banque représente ainsi 11280 clones dont la taille moyenne des inserts avoisine 38 kb. Le génome nucléaire de *C. reinhardtii* y est donc statistiquement représenté environ quatre fois.

Le criblage de cette banque avec une sonde correspondant au clone CD142 a conduit à l'isolement un clone d'ADN génomique dénommé 18B1. L'insert présent dans cet unique cosmide a été analysé plus en détail. Après restriction par NotI puis hybridation avec la sonde CD142, seule une bande d'environ 9 kb reste positive, indiquant que toute l'information correspondant au clone CD142 est présente dans ce fragment. La séquence génomique correspondant au clone CD142 est présentée ci dessous.

Protocoles détaillés :

- Préparation des filtres de nylon pour le criblage : les filtres de nylon (Hybond N, Amersham Buchler, Braunschweig, Allemagne) sont délicatement déposés sur une boîte de pétri contenant un milieu de croissance bactérien riche supplémenté avec l'antibiotique adéquat (dans le cas présent, c'est l'ampicilline qui est utilisée). Chaque clone d'*E. coli* contenu dans la banque est alors répliqué directement sur le filtre de Nylon à l'aide d'un appareil à réplique et les boîtes ainsi préparées sont incubées une nuit à 37°C. Les filtres sont ensuite ôtés de la surface gélosée puis soumis au traitement suivant :

- (1) 2 min sur une solution de dénaturation (NaOH 0,5 M ; NaCl 1,5 M)
- (2) 2 min sur une solution de neutralisation (Tris/HCl pH 7,0 0,5 M ; NaCl 1,5 M)
- (3) 2 min sur une solution de rinçage (tampon 2 x SSC)

Les filtres sont finalement incubés dans une étuve à sec pendant 2 heures à 80°C.

- Préhybridation et hybridation des filtres : la préhybridation est effectuée dans le tampon d'hybridation à 42°C pendant au moins 4 heures. L'hybridation est accomplie à 42°C une nuit complète en présence de la sonde nucléotidique marquée par le ³²P. Le lavage de la membrane s'effectue à 60°C dans la solution de lavage adaptée à la stringence que l'on veut appliquer. Le temps et la fréquence de

changement des bains de lavage varient selon la stringence et les niveaux de radioactivité détectés sur la membrane. En général, les bains sont renouvelés toutes les 10 min et le lavage commence avec un tampon de lavage de faible stringence pour terminer par un tampon de plus forte stringence. Un film Kodak X-OMAT AR est finalement exposé aux filtres à -80°C afin de révéler les clones positifs.

Composition des solutions et tampons :

Tampon SSC x 20 : Dissoudre 175,3 g de NaCl et 88,2 g de citrate de sodium dans 800 ml d'eau. Ajuster le pH à 7,0 avec quelques gouttes d'une solution de NaOH 10N. Compléter avec de l'eau jusqu'à 1 litre.

Tampon d'hybridation :

Formamide	50%
Denhardt's	x 5
SDS	0,5%
Tampon Phosphate de Na pH 7,0	50 mM
ADN de sperme de saumon	100 $\mu\text{g/ml}$
Sérum albumine bovine	0,5%

Réactif de Denhardt's x 100 (quantité pour 500 ml dans l'eau) :

Ficoll 400	10 g
PolyVinylPyrrolidone 40 (PVP40)	10 g
BSA	10 g

Tampon Phosphate pH 7,0 à 1 M (quantité pour 100 ml de tampon) :

Na_2HPO_4	1M	57,7 ml
NaH_2PO_4	1M	42,3 ml

Tampons de lavage :

faible stringence :	SSC x 2 ; SDS 0,2%
stringence moyenne :	SSC x 1 ; SDS 0,5%
forte stringence :	SSC x 0,5 ; SDS 0,5%
	SSC x 0,1 ; SDS 0,5%

- Préparation et marquage d'une sonde nucléotidique au ^{32}P : le fragment servant de sonde nucléotidique est généralement inséré dans le site de clonage multiple d'un plasmide bactérien. Il est donc d'abord nécessaire de le digérer, avec les

endonucléases de restriction adéquates puis de séparer le fragment d'intérêt du reste du plasmide par électrophorèse sur gel d'agarose 1% tamponné avec du tampon TAE x 1. La bande correspondant au fragment d'intérêt est ensuite découpée du gel et l'extraction de l'ADN effectuée avec le kit « The GENECLAN II Kit » commercialisé par BIO 101 Inc. (La Jolla, CA, USA). Le morceau d'agarose est tout d'abord dissout dans une solution d'iodure de sodium 6 M. Lorsque la dissolution est achevée, les molécules d'ADN sont alors captées par une matrice de silice dénommée « Glassmilk ». Les molécules d'ADN en présence de l'agent chaotrope NaI s'adsorbent spécifiquement sur les billes de silice. Après avoir éliminé les sels et l'agarose dissout, les molécules d'ADN sont éluées des billes de silices en présence d'eau stérile.

Le marquage d'une sonde nucléotidique au ^{32}P est menée à bien grâce au kit « Random primed DNA labelling kit » de Boehringer (Mannheim, Allemagne). Le principe est l'amorçage aléatoire de la réaction d'élongation par l'ADN polymérase de Klenow par utilisation d'un mélange d'héxanucléotides représentant toutes les combinaisons de séquences possibles. L'incorporation de l'élément radioactif s'effectue à partir de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (3000 Ci/mmol) dont 50 μCi sont utilisées pour chaque réaction de marquage. La sonde radiomarquée est finalement ajoutée à la solution d'hybridation après dénaturation à 95°C pendant 4 min.

C) Le locus *STA2* chez *C. reinhardtii* représente le gène de structure de la GBSSI

L'analyse qui suit démontre de manière formelle que le gène *STA2* de *C. reinhardtii* correspond au gène de structure de la GBSSI et que le clone CD142 représente un ADNc issu de ce locus. En effet, des analyses de restriction de l'ADN génomique digéré par l'endonucléase BamHI révèlent une modification profonde du profil de restriction dans la souche BAFR1 mutante au locus *STA2* générée par interruption génique (Delrue et coll. 1992). La même modification est aussi observée dans la souche IJ2 double mutante aux loci *STA2* et *STA3* que Maddelein et coll. (1994) ont généré par croisement de la souche BAFR1 avec une souche mutante *sta3-1*.

De plus, cette modification du profil de restriction dans la descendance méiotique de la souche IJ2 fusionnée à la souche de *C. smithii* « CS9 » a pu être suivie dans le croisement suivant :

CS9 (<i>C. smithii</i>) +/+	X	IJ2 (<i>C. reinhardtii</i>) <i>sta2-29::ARG7/sta3-1</i>
	↓	
	+/+	25%
<i>sta2-29::ARG7/sta3-1</i>		25% descendance
<i>sta2-29::ARG7/+</i>		25% méiotique
<i>+/sta3-1</i>		25%

352 ségrégeants issus de ce croisement ont été purifiés, amplifiés et leur phénotype d'accumulation d'amidon analysé. 54 recombinants méiotiques ont fait l'objet d'une analyse de restriction dont 21 de génotype *sta2-29::ARG7/+*, 19 de génotype *+/sta3-1* et 14 sauvages. En ce qui concerne les 21 ségrégeants de génotype *sta2-29::ARG7/+* leur profil de restriction, obtenu par digestion avec BamHI et hybridé avec la sonde CD142, présente toujours la même modification que la souche parentale IJ2. On en déduit donc que le gène *STA2* et la sonde CD142 sont très fortement liés génétiquement. Il n'y a maintenant plus de doute quant à la nature du clone CD142 qui représente le gène de structure de la GBSSI (le locus *STA2*).

Protocoles détaillés :

Réalisation des croisements : avant de réaliser la fusion de cellules de polarités sexuelles opposées, il est nécessaire de les mettre dans un état propice à leur fusion. Ainsi les cellules doivent d'abord être différenciées en gamètes avant qu'elles ne soient mises en contact direct. La gamétogenèse est induite chez *Chlamydomonas* en soumettant les cellules à une carence azotée et en présence d'une source lumineuse intense (5000 lux). Pour cela des cellules fraîches cultivées sur milieu gélosé riche (culture de moins de 5 jours) sont mises en suspension dans 2 ml de milieu TAP-N et laissées au minimum 12 heures en lumière forte sans agitation. Avant la mise en contact l'état des cellules est examiné au microscope optique. Après différenciation en gamètes, les cellules sont plus petites et surtout beaucoup plus actives que lors d'une culture non carencée. Des quantités équivalentes de cellules de chaque polarité sexuelle sont mélangées. La fusion est menée toujours en lumière intense. Après une

heure de contact, des fusions cellulaires sont déjà visibles au microscope optique. L'analyse des ségrégeants méiotiques va consister à déposer les produits de la fusion cellulaire sur un milieu riche à 4% agar. Les boîtes ainsi obtenues sont incubées en lumière atténuée pendant 15 heures puis entreposées à l'obscurité totale pendant au moins une semaine. Ceci permet la maturation des zygotes et leur « enkystement » dans l'agar à 4%. Après cette période d'incubation à l'obscurité, les boîtes sont remises à la lumière et les étapes suivantes sont réalisées le plus rapidement possible. Afin d'éliminer le plus grand nombre de cellules végétatives non fusionnées, on gratte très légèrement la surface de la gélose avec une lame de rasoir. Par observation à la loupe binoculaire, une région regroupant une cinquantaine de zygotes est repérée et ceux-ci sont transférés sur une boîte fraîche de milieu riche à 1,5% d'agar. Afin de s'assurer de la disparition complète des cellules végétatives résiduelles la boîte est soumise à des vapeurs de chloroforme pendant 45 secondes à une minute (les zygotes peuvent résister, contrairement aux autres cellules, à ce temps moyen d'exposition aux vapeurs de chloroforme). La présence de lumière va déclencher de façon irréversible l'entrée en méiose des zygotes. Lors de leur germination (facilité par l'humidité plus importante du milieu contenant 1,5% d'agar) les zygotes vont libérer quatre cellules filles haploïdes (une tétrade) qui vont croître par divisions mitotiques et former des colonies sur boîte. L'analyse des produits de méiose peut-être menée de deux manières. La première consiste à étudier de manière aléatoire au moins 200 ségrégeants issus du croisement. Après purification des ségrégeants, les caractères de ces derniers peuvent être étudiés par répliques sur différents milieux sélectifs.

Techniques d'extraction d'ADN génomique : le protocole d'extraction de l'ADN total utilisé est celui décrit par Rochaix et coll. (1991) : en voici le détail :

(1) Centrifuger 10 ml de culture cellulaire à environ $3-5 \times 10^6$ cellules/ml pendant 10 min à 3500 g en falcon de 15 ml.

(2) Le culot de cellules est ensuite resuspendu dans 350 μ l du tampon suivant :

TRIS/HCl pH 8,0	20 mM
EDTA	50 mM
NaCl	100 mM.

(3) Ajouter 50 μ l de protéinase K d'une solution stock à 2 mg/ml (à défaut, on peut utiliser de la pronase à 10 mg/ml).

- (4) Ajouter 25 μ l de SDS à 20% et incuber 2 heures à 55°C.
- (5) Ajouter 2 μ l de diethylpyrocarbonate (DEPC) et incuber pendant 15 min à 70°C.
- (6) Refroidir le tube brièvement dans la glace et ajouter 50 μ l d'une solution d'acétate de potassium à 5 M.
- (7) Mélanger en agitant le tube correctement et laisser reposer sur la glace au moins 30 min (il est possible de stopper l'extraction à ce moment là et de la reprendre le lendemain si on laisse les tubes dans la glace en chambre froide).
- (8) Transférer dans un tube « eppendorf » de 1,5 ml et centrifuger 15 min dans une minifuge (à environ 13000 g).
- (9) Récupérer le surnageant en le transférant dans un nouveau tube « eppendorf ».
- (10) Extraire le surnageant par un volume du mélange suivant :

Phénol (saturé par le TE : Tris/HCl pH 8,0 10 mM, EDTA 1 mM)	25 vol
Chloroforme	24 vol
Alcool isoamylique	1 vol
- (11) Après extraction, ajouter 1 ml d'éthanol 100% à température de la pièce. On doit voir apparaître un précipité sous forme de « cheveux d'ange » si l'extraction est réussie. A partir de ce moment, il faut manipuler avec soin et douceur afin d'éviter que les molécules d'ADN ne se brisent.
- (12) Centrifuger 5 min dans une minifuge (environ 13000 g).
- (13) Rincer le culot avec de l'éthanol à 70% et centrifuger 3 min en minifuge.
- (14) Recommencer l'opération (13) une ou deux fois afin d'éliminer les sels correctement.
- (15) Sécher le culot en le plaçant 5 min à 37°C, puis le dissoudre dans 50 μ l de TE contenant de la RNase de pancréas de bœuf à 1 μ g/ml.

Hybridations moléculaires et analyses par Southern Blot : 25 μ g d'ADN sont digérés totalement avec la ou les endonucléases de restriction adéquates. Les produits de la restriction sont ensuite séparés par électrophorèse en gel d'agarose 0,8%, TBE x 1. Puis le gel est incubé successivement 15 min dans la solution de dépurination et 30 min dans la solution de dénaturation. L'ADN dénaturé est ensuite transféré sur membrane de nylon « Porablot NYplus » (Macherey-Nagel GmbH, Düren,

Allemagne) par capillarité avec le tampon SSC x 20. Après le transfert, la membrane est incubée à 80°C sous vide d'air pendant 2 heures afin de fixer les fragments d'ADN à la surface de la membrane de nylon. La préhybridation est effectuée dans le tampon d'hybridation à 42°C pendant au moins 4 heures. L'hybridation est accomplie à 42°C une nuit complète en présence de la sonde marquée précédemment préparée. Le lavage de la membrane s'effectue à 60°C dans le tampon de lavage adapté à la stringence que l'on veut appliquer au lavage. Le temps et la fréquence de changement des bains de lavage varient selon la stringence et les niveaux de radioactivité présents sur la membrane. En général, les bains sont renouvelés toutes les 10 min et le lavage commence avec un tampon de lavage de faible stringence pour finir avec un tampon de plus forte stringence. Un film Kodak X-OMAT AR est finalement exposé à la membrane à -80°C afin de révéler les zones d'hybridation.

II) Etude de la liaison de la GBSSI au grain d'amidon.

A) Analyse de l'allèle mutant *sta2-1*

Parmi tous les allèles mutants générés au locus *STA2* chez *C. reinhardtii* un seul conduit à la production d'une GBSSI tronquée de 58 kDa en lieu et place de la protéine sauvage de 76 kDa. C'est le cas de l'allèle *sta2-1* de la souche 18B. Delrue et coll. (1992) par micro-séquençage de la GBSSI extraite d'un gel de polyacrylamide a pu démontrer que les séquences peptidiques amino-terminales des protéines de la souche sauvage (137C) et de la souche mutante (18B) sont identiques.

Séquences amino-terminales :

- GBSSI de la souche 137C : ALDIVMVAAEVAPGGKTGGLGDV
- GBSSI de la souche 18B : ALDIVMVAAEVAPGGKTGGLGDV

La protéine produite par l'allèle mutant *sta2-1* est donc tronquée en position carboxy-terminale et le K_m pour l'ADP-glucose est accrue d'un facteur 6. L'absence de cette séquence carboxy-terminale ne modifie cependant pas les propriétés de fixation de la protéine sur le grain comme le montre la figure 1.

Protocole détaillé :

Technique d'extraction des protéines du grain d'amidon et SDS-PAGE : les protéines sont extraites de 0,3 à 1 mg d'amidon avec 60 μ l de tampon d'extraction : β -mercaptoéthanol 5% (v/v) ; SDS 2% (p/v) à 100°C pendant 5 min. Après centrifugation à 13000 g pendant 10 min, le surnageant est récupéré et l'opération est renouvelée une fois avec le culot. Les deux surnageants sont réunis et l'échantillon peut être chargé dans les puits du gel après avoir rajouté 10 μ l du tampon de chargement suivant : Tris 50 mM, glycine 384 mM, 20% glycérol, SDS 0,1%, bleu de bromophénol 0,001%. La migration est accomplie à température ambiante, à 150 V pendant 1h30 (jusqu'à ce que le bleu de bromophénol quitte le gel). Les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie ou par immunodétection (voir plus loin le chapitre spécifique au Western Blot). Lors de la coloration au bleu de Coomassie, le gel est incubé 30 min. dans la solution suivante : 2 g de Coomassie Brilliant Blue R250, 0,5 g de Coomassie Brilliant Blue G250, 425 ml d'éthanol, 50 ml de méthanol, 100 ml d'acide acétique qsp 1000 ml avec de l'eau. Le gel est ensuite décoloré à l'aide des solutions suivantes :

➤ 15 à 30 min dans le décolorant I : 450 ml d'éthanol, 50 ml d'acide acétique, qsp 1000 ml avec de l'eau.

➤ une nuit dans le décolorant II: 80 ml d'acide acétique, 50 ml de méthanol, qsp 1000 ml avec de l'eau ; ce décolorant II permet d'éliminer la coloration non spécifique du gel.

➤ le décolorant III (240 ml d'acide acétique, 200 ml de méthanol, qsp 1000 ml avec de l'eau) permet la décoloration totale du gel si nécessaire.

B) Estimation de la quantité de protéines liées au grain

La quantité de protéines liées au grain d'amidon a été estimée dans différentes conditions de culture et dans des fonds génétiques variables. Pour cela, les cellules ont été placées en conditions d'accumulation massive d'amidon (milieu carencé en azote) ou en conditions de croissance mixotrophe (présence d'azote). Les protéines extraites du grain ont ensuite été déposées sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (présence de SDS). Après la migration, les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie. Au cours de cette expérience la souche I7 mutante

au locus *STAI* a été utilisée. Cette mutation a été décrite en détail par Van den Koornhuyse et coll. (1996) puis par Van de Wal et coll. (1998). Le locus *STAI* correspond au gène de structure de la grande sous-unité régulatrice de l'ADP-glucose pyrophosphorylase. La mutation *sta1-1* engendrée lors d'une mutagenèse aux rayons X conduit à l'insensibilité de l'enzyme à l'acide 3-phosphoglycérique, son activateur allostérique. Dès lors, la souche I7 accumule moins de 5% de la quantité normale d'amidon. L'estimation de la quantité de GBSSI liée au grain est d'environ 0,1% du poids d'amidon en condition de carence azotée pour les souches 137C et 18B. Cette valeur atteint 1% dans les conditions de mixotrophie. Dans le cas de la souche I7, quelque soit les conditions de culture, la GBSSI représente plus de 1% du poids du grain d'amidon. Les techniques employées lors de cette analyse sont les mêmes que celles détaillées au paragraphe précédent.

C) Analyse de la réponse immunitaire en Western Blot

Afin de tester l'antigénicité des antiséras SA137C et SAIJ2 précédemment obtenus chez le lapin, les protéines extraites de 100 µg d'amidon frais provenant de différentes souches cultivées dans des conditions de culture variables ont été soumises à une analyse par la technique d'immunotransfert (Western Blotting). La réponse immunitaire engendrée vis à vis de la GBSSI lors de l'injection de l'amidon de la souche sauvage (137C) s'avère très spécifique et forte (les protéines étant extraites de seulement 100 µg d'amidon frais) même dans le cas de la protéine tronquée chez le mutant *sta2-1*. La quantité de protéines liées au grain d'amidon semble plus importante chez le mutant I7 lors d'une culture carencée en azote comme le montre la présence d'une bande de masse supérieure à la GBSSI révélée par l'antisérum SA137C. Ce fait est confirmé par l'analyse en Western blot réalisée avec l'antisérum SAIJ2 où la réponse immunitaire la plus forte est détectée avec les protéines extraites de l'amidon de la souche I7 cultivée en carence azotée.

A des fins de contrôle, nous avons effectué le même type d'expérience en utilisant l'antisérum PA55 obtenu par Abel et coll. (1995). Cet antisérum engendré chez le lapin est dirigé contre un peptide dont la séquence consensus correspond à la région carboxy-terminale fortement conservée dans toutes les amidon-synthétases de plantes supérieures, qu'elles soient solubles ou liées au grain d'amidon. Cet antisérum

reconnaît spécifiquement la GBSSI de *C. reinhardtii* lorsqu'elle est présente dans le grain. D'autre part, l'antisérum PA55 reconnaît aussi la protéine tronquée produite par le mutant 18B (*sta2-1*). Il semble donc que la séquence fortement conservée en position carboxy-terminale soit toujours présente dans la protéine tronquée.

Protocoles détaillés :

Technique d'extraction des protéines du grain d'amidon et SDS-PAGE : ces techniques sont les mêmes que celles décrites au paragraphe précédent hormis la coloration au bleu de Coomassie qui est omise dans ce cas.

Technique de transfert et de révélation par les antiséras : lorsque la migration sur SDS-PAGE est terminée, le gel est incubé 30 min dans le tampon « Western » x 1 contenant 20% de méthanol. Les protéines sont ensuite électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose (Protan BA 85 Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne) à l'aide d'un appareil d'électrotransfert (Multiphor II, LKB-Pharmacia, Bromma, Suède) à 4°C dans les conditions suivantes: 45 min à 250 mA avec le tampon utilisé précédemment. Après cette étape de transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose, cette dernière est incubée 1 heure à température ambiante dans le tampon TBST contenant 3% de BSA. La membrane est ensuite rincée trois fois dans le tampon TBST avant d'être incubée une nuit à 4°C dans l'antisérum primaire de lapin dilué dans le tampon TBS. La membrane est de nouveau rincée trois fois par le tampon TBST puis est incubée une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire biotinylé dilué à 1/500 dans le TBS dirigé contre l'antisérum de lapin. Après trois nouveaux rinçages dans le tampon TBST, la membrane est incubée 30 min à température ambiante avec le complexe streptavidine-phosphatase alcaline dilué à 1/3000 dans le tampon TBS. Finalement, après 3 rinçages dans le tampon TBST, les membranes sont révélées par incubation dans un tampon de diéthanolamine contenant les substrats de la phosphatase alcaline : NBT et BCIP (le temps d'incubation varie selon l'intensité de la réaction). Le kit de détection utilisé est celui proposé par Amersham Buchler (Braunschweig, Allemagne): « Blotting detection kit for rabbit antibodies »

Composition des solutions et tampons :

Tampon « Western » x 10:	Glycine	390 mM
	Tris	480 mM
	SDS	0,375 %
Tampon TBS (Tris Buffer Saline)	Tris/HCl pH 7,5	20 mM
	NaCl	500 mM

Tampon TBST (Tris Buffer Saline Tween): TBS + 0,1 % (v/v) Tween 20

NBT: Nitro-Blue Tetrazolium en solution dans le diméthylformamide 70 %

BCIP: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate en solution dans le diméthylformamide.

III) Ciblage des protéines de fusion dans le grain d'amidon

L'extension carboxy-terminale spécifique de la GBSSI de *C. reinhardtii* n'est pas requise pour le ciblage de la protéine au grain d'amidon *in vivo* comme nous avons pu le démontrer au cours des expériences précédentes. Cette extension d'environ 16 kDa peut être remplacée par une séquence peptidique d'intérêt, autorisant ainsi son ciblage au cœur même du grain d'amidon.

Les différents types de vecteurs susceptibles d'être construits afin d'appliquer cette méthode chez les plantes supérieures, sont constitués :

- d'un gène de sélection et une origine de répllication bactériens afin de pouvoir amplifier le plasmide dans une souche bactérienne appropriée.

- d'un gène de sélection qui permettra une sélection aisée des plantes transformantes

- d'une fusion traductionnelle entre la séquence codante de la GBSSI et une séquence polypeptidique d'intérêt. Deux types de fusions traductionnelles principales peuvent être considérées : dans le premier cas, c'est la séquence tronquée de 58 kDa de la GBSSI qui est fusionnée à la séquence d'intérêt ; dans le deuxième cas, c'est la séquence complète de la GBSSI qui est employée.

- la fusion pourra être placée sous le contrôle d'un promoteur végétal constitutif fort, ou encore d'un promoteur végétal inductible, immédiatement suivi d'un peptide de transit adapté favorisant la translocation de la protéine de fusion vers le chloroplaste.

IV) Protocole de dosage de l'activité amidon-synthétase liée au grain :

20 µg d'amidon sont ajoutés à 100 µl du mélange réactionnel suivant :

Glycylglycine/NaOH pH 9,0	50 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM
β-n ercaptoéthanol	5 mM
MgCl ₂	5 mM
Sérum albumine bovine	0,5 mg/ml
ADP-glucose	0,2 mM
[U ¹⁴ C]ADP-glucose (235 mCi/mmol	2,66 µg
Citrate trisodique	0 ou 0,5 M (précisé selon le cas)

La réaction est menée à 30°C pendant 15 min. puis arrêtée par addition de 3 ml d'éthanol à 70%. Le précipité obtenu est filtré sous vide sur filtre "Whatman Glass Fiber" (Whatman, Maidstone, Angleterre), rincé par 4 x 5 ml d'éthanol 70%. Le comptage radioactif est réalisé avec un compteur Beckman après avoir introduit les filtres dans des fioles de comptage contenant 3,5 ml de liquide de scintillation.

V) méthodes d'extraction et de purification d'amidon sont les suivantes :

- cas d'une algue verte unicellulaire telle que *Chlamydomonas reinhardtii* (voir la méthode décrite ci-dessus)

- cas de graines, de tubercules ou tout autre organe de plante supérieure :

l'organe ou le type prélevé sur la plante est correctement homogénéisé (après broyage). Le broyat ainsi obtenu est rincé avec de l'eau au travers d'un tissu filtrant (tel que le Miracloth Calbiochem, La Jolla, CA, USA). Le filtrat est ensuite laissé au repos pendant deux heures afin de permettre aux grains d'amidon de sédimenter. Le sédiment est rincé une première fois avec plusieurs volumes d'eau puis une deuxième fois avec plusieurs volumes d'une solution de NaCl à 0,1M. Le sédiment est une nouvelle fois filtré puis rincé deux fois avec de l'éthanol avant d'être séché.

BIBLIOGRAPHIE

Abel G., Springer F., Willmitzer L. and Kossmann J., (1996), *The Plant Journal*, 10 (6) : 981-991

An *et al.* (1986), *Plant Physiol.*, **81**, 301-305

Baba T., Nishihara M., Mizuno K., Kawasaki T., Shimada H., Kobayashi E., Ohnishi S., Tanaka K. and Arai Y., (1993), *Plant Physiology*, 103 : 565-573

Bevan M. (1984), *Nucleic Acids. Res.*, **12**, 8711-8721

Brodelius *et al.* (1979), *FEBS Letters*, **103**, 93-97

Brodelius (1988), In: Moo-Young M. (Ed), *Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells: Fundamentals and Applications*, Elsevier, Londres

Buléon A., Colonna P., Planchot V., Ball S. (1998), *International Journal of Biological Macromolecules*, **23** : 85-112

De La Penna *et al.* (1987), *Nature*, **325**, 274-276

Delrue B., Fontaine T., Routier F., Decq A., Wieruszeski J-M, van den Koornhuyse N., Maddelein M-L., Fournet B. and Ball S. (1992), *Journal of Bacteriology*, 174 (11) : 3612-3620

Deno *et al* (1987), *J. Plant. Physiol.*, **131**, 315-322

Denyer K., Clarke B., Hylton C., Tatge H. and Smith A., (1996), *Plant, Cell and Environment*, 18 : 1019-1026

Denyer K., Hylton C. and Smith A., (1995), *Planta*, 196 : 256-265

Dry I., Smith A., Edwards A., Battacharyya M., Dunn P. and Martin C. (1992), *The Plant Journal*, 2 (2) : 193-202

Edwards A., Marshall J., Sidebottom C., Visser R., Smith A. and Martin C. (1995), *The Plant Journal*, 8 (2) : 283-294

Fontaine T., D'Hulst C., Maddelein M-L, Routier F., Marianne Pépin T., Decq A., Wieruszeski J-M., Delrue B., van den Koornhuysse N., Bossu J-P., Fournet B. and Ball S., (1993), *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (22) : 16223-16230

Gao M., Wanat J., Stinard P.S., James M.G., Myers A.M. (1998) *Plant Cell*, 10(3) : 399-412

Hovenkamp-Hermelink J., Jacobsen E., Ponstein A., Visser R., Vos-Scheperkeuter G., Bijmolt E., de Vries J., Witholt B. and Feenstra W. (1987), *Theoretical and Applied Genetics*, 75 : 217-221

Jouanin *et al.* (1987), *Plant Sci.*, 53, 53-63

MacDonald F. and Preiss J., (1985), *Plant Physiology*, 78 : 849-852

Maddelein M-L., Libessart N., Bellanger F., Delrue B., D'Hulst C., van den Koornhuysse N., Fontaine T., Wieruszeski J-M., Decq A. and Ball S., (1994), *The Journal of Biological Chemistry*, 269 (40) : 25150-25157

Marshall J., Sidebottom C., Debet M., Martin C., Smith A. and Edwards A., (1996), *The Plant Cell*, 8 : 1121-1135

Mu C., Harn C., Ko Y-T., Singletary G., Keeling P. and Wasserman B., (1994), *The Plant Journal*, 6 (2) : 151-159

Müller-Röber B., Sonnewald U. and Willmitzer L. (1992), *The EMBO Journal*, 11(4) : 1229-1238

Rochaix J., Mayfield S., Goldschmidt-Clermont M. and Erickson J., (1991), *Plant Molecular Biology : a Practical Approach*, pp 253-275, ed. Shaw C., IRL Press, Oxford

Sanford J.C. (1988), *Trends in Biotechnology*, 6, 299-302

Shannon J. and Garwood D. (1984), In *Starch: Chemistry and Technology*, 2nd ed., Whistler R., Bemiller J., Paschall E., eds., Academic Press, San Diego, California : 26-86

Smith A., (1990), *Planta*, 182 : 599-604

Tsai C-Y., (1974), *Biochemical Genetics*, 11 (2) : 83-95

Van den Koornhuyse N., Libessart N., Delrue B., Zabawinski C., Decq A., Iglesias A., Carton A., Preiss J. and Ball S., (1996), *The Journal of Biological Chemistry*, 271(27) : 16281-16287

Van de Wal et al (1998), *The Journal of Biological Chemistry*, 273(35) : 22232-22240

Zhang H., Herman P. and Weeks D., (1994), *Plant Molecular Biology*, 24 : 663-672

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend, dans le sens 5'→3', une séquence nucléotidique codant pour une adénosine diphosphate glucose α -1, 4-glucane α -4-glucosyltransférase ou amidon-synthétase EC 2.4.1.21, ou pour une protéine dérivée de cette enzyme, notamment par suppression, addition ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ladite enzyme ou protéine dérivée ayant la propriété de migrer vers les sites de biosynthèse des grains d'amidon dans les cellules végétales et de s'associer aux grains d'amidon, ladite séquence nucléotidique codant pour l'enzyme ou protéine susmentionnée étant placée en amont d'une séquence nucléotidique codant pour un peptide ou polypeptide d'intérêt.

2. Séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 1, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique codant pour une amidon-synthétase, ou pour une protéine dérivée, code pour l'amidon-synthétase liée au grain d'amidon ou GBSS présente notamment chez les plantes, algues ou micro-algues, et plus particulièrement pour l'isoforme GBSSI, ou pour une protéine dérivée de la GBSS telle que définie dans la revendication 1.

3. Séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique codant pour une amidon-synthétase, ou pour une protéine dérivée, est choisie parmi :

- la séquence nucléotidique de l'ADNc d'environ 2900 à 3100 paires de bases, et dont les 1696 paires de bases de l'extrémité 3' sont représentés sur la figure 1, ladite séquence nucléotidique :

- . codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* d'environ 640 à 680 acides aminés, dont l'extrémité aminoterminal correspond à l'enchaînement d'acides aminés suivant : ALDIVMVAAEVAPGGKTGGLGDV, et dont l'extrémité carboxyterminale correspond à l'enchaînement d'acides aminés représenté sur la figure 1,

- . et étant obtenue par criblage d'une banque d'ADNc préparée à partir de cellules de *Chlamydomonas reinhardtii*, à l'aide d'un antisérum obtenu par

immunisation de lapins avec de l'amidon extrait des cellules susmentionnées de *Chlamydomonas reinhardtii*,

- ou un fragment nucléotidique de l'ADNc susmentionné, codant pour un fragment peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*, ledit fragment peptidique comprenant l'intégralité de la partie aminoterminal de ladite GBSSI, et étant délimité à son extrémité carboxyterminale par l'acide aminé situé en l'une des positions 25 à 238, ou en l'une des positions 118 à 238, de la séquence en acides aminés représentée sur la figure 1,

- ou une séquence nucléotidique dérivée par dégénérescence du code génétique de la séquence nucléotidique de l'ADNc susmentionné, ou d'un fragment nucléotidique susmentionné de cette dernière, et codant pour la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* susmentionnée, ou pour un fragment peptidique susmentionné de cette dernière,

- ou une séquence nucléotidique dérivée d'une séquence ou d'un fragment nucléotidique susmentionnés, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, et codant une séquence peptidique dérivée de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* susmentionnée, ou dérivée d'un fragment peptidique susmentionné de cette dernière, et ayant la propriété de s'associer aux grains d'amidon, ladite séquence nucléotidique dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 50%, avec la séquence ou fragment nucléotidique susmentionnés,

- ou une séquence nucléotidique susceptible d'hybrider avec une des séquences ou fragments nucléotidiques susmentionnés.

4. Séquence nucléotidique recombinante selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique codant pour un peptide ou polypeptide d'intérêt est choisie parmi :

- celles codant des peptides biologiquement actifs, notamment des peptides d'intérêt thérapeutique ou utilisables dans le domaine agroalimentaire, ou

- celles codant des enzymes susceptibles de transformer l'amidon, telles que les enzymes interagissant avec les α -glucanes dont les hydrolases diverses, les phosphorylases, les α -1,4 glucanotransférases, les enzymes de branchement, les

amylases, et notamment les hydrolases thermostables issues de bactéries extrémophiles telles que les archaebactéries actives à des températures supérieures à 40 °C.

5. Séquence nucléotidique recombinante selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique codant un site de clivage, ladite séquence nucléotidique étant placée entre la séquence nucléotidique codant pour une amidon-synthétase, ou une protéine dérivée de cette dernière, et la séquence nucléotidique codant le polypeptide d'intérêt.

6. Cellules végétales transgéniques, choisies parmi les cellules de plantes, d'algues ou de micro-algues, capables de fabriquer de l'amidon, lesdites cellules comprenant une séquence nucléotidique recombinante selon l'une des revendications 1 à 5 intégrée dans son génome ou maintenue de manière stable dans son cytoplasme.

7. Plantes, algues ou micro-algues transgéniques, ou parties, notamment fleurs, fruits, feuilles, tiges, racines, ou fragments de ces plantes, algues ou micro-algues, comprenant une séquence nucléotidique recombinante selon l'une des revendications 1 à 5 intégrée dans le génome ou maintenue de manière stable dans le cytoplasme des cellules les composant.

8. Polypeptide de fusion caractérisé en ce qu'il comprend :

- en position N-terminale une amidon-synthétase, ou une protéine dérivée de cette enzyme, notamment par suppression, addition ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ladite amidon-synthétase ou protéine dérivée ayant la propriété de migrer vers les sites de biosynthèse des grains d'amidon dans les cellules végétales et de s'associer aux grains d'amidon,

- et, en position C-terminale, un peptide ou polypeptide d'intérêt, la partie C-terminale de la séquence en acides aminés de l'amidon-synthétase, ou de la protéine dérivée, étant ainsi liée à la partie N-terminale de la séquence peptidique d'intérêt, ledit polypeptide de fusion étant codé par une séquence nucléotidique recombinante selon l'une des revendications 1 à 5.

9. Polypeptide de fusion selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'amidon-synthétase est choisie parmi :

- la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* d'environ 640 à 680 acides aminés, dont l'extrémité aminoterminal correspond à l'enchaînement d'acides aminés suivant: ALDIVMVA AEVAPGGKTGGLGDV, et l'extrémité carboxyterminale correspond à l'enchaînement d'acides aminés représenté sur la figure 1, ladite GBSSI étant codée par la séquence nucléotidique obtenue par criblage d'une banque d'ADNc préparée à partir de cellules de *Chlamydomonas reinhardtii*, à l'aide d'un antisérum obtenu par immunisation de lapins avec de l'amidon extrait des cellules susmentionnées de *Chlamydomonas reinhardtii*,

- ou un fragment peptidique de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*, ledit fragment peptidique comprenant l'intégralité de la partie aminoterminal de ladite GBSSI, et étant délimité à son extrémité carboxyterminale par l'acide aminé situé en l'une des positions 25 à 238, ou en l'une des positions 118 à 238, de la séquence en acides aminés représentée sur la figure 1,

- ou une séquence peptidique dérivée d'une séquence ou d'un fragment peptidique susmentionnés, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, et ayant la propriété de s'associer aux grains d'amidon, ladite séquence peptidique dérivée ayant de préférence une homologie d'au moins environ 60%, avec la séquence ou fragment peptidique susmentionnés.

10. Polypeptide de fusion selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il comprend un site de clivage placé entre d'une part l'amidon-synthétase, ou une protéine dérivée de cette dernière, et, d'autre part, le polypeptide d'intérêt.

11. Grains d'amidon caractérisés en ce qu'ils comprennent un ou plusieurs polypeptides de fusion définis dans l'une des revendications 8 à 10.

12. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend des grains d'amidon selon la revendication 11, le cas échéant en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, lesdits grains contenant un ou plusieurs polypeptides de

fusion tels que définis dans l'une des revendications 8 à 10, le peptide d'intérêt dans lesdits polypeptides de fusion possédant un effet thérapeutique déterminé.

13. Composition pharmaceutique selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle se présente sous une forme administrable par voie parentérale, notamment par voie intraveineuse, ou sous une forme administrable par voie orale, le diamètre des grains d'amidon étant compris entre environ 0,1 μm et quelques dizaines de μm , et la proportion en poids des polypeptides de fusion dans ces grains étant comprise entre environ 0,1 % et 1 %.

14. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs polypeptides de fusion tels que définis dans l'une des revendications 8 à 10, le cas échéant en association avec un véhicule physiologiquement acceptable, le peptide d'intérêt dans lesdits polypeptides de fusion possédant un effet thérapeutique déterminé.

15. Composition alimentaire caractérisée en ce qu'elle comprend des grains d'amidon selon la revendication 11, lesdits grains contenant un ou plusieurs polypeptides de fusion tels que définis dans l'une des revendications 8 à 10, le peptide d'intérêt dans lesdits polypeptides de fusion étant utilisable dans le domaine agroalimentaire.

16. Procédé de préparation de grains d'amidon selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- transformation de cellules végétales, à l'aide d'un hôte cellulaire, tel que *Agrobacterium tumefaciens*, transformé par un vecteur recombinant, notamment du type plasmide, cosmide ou phage, contenant une séquence nucléotidique recombinante selon l'une des revendications 1 à 5,

- obtention de plantes, algues ou micro-algues transformées de manière à ce que leur génome contienne une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 1 à 5, par culture *in vitro* des cellules hôtes transformées susmentionnées,

- le cas échéant, fécondation et récupération des semences des plantes obtenues à l'étape précédente, et mise en culture de ces semences pour l'obtention de plantes de génération suivante,

- extraction des grains d'amidon à partir des plantes, algues ou micro-algues, ou de parties, notamment fleurs, fruits, feuilles, tiges, racines, ou de fragments de ces plantes, algues ou micro-algues transformées susmentionnées, notamment par sédimentation.

17. Procédé de préparation de polypeptides de fusion selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre du procédé selon la revendication 16, ledit procédé comprenant une étape supplémentaire de récupération, et le cas échéant de purification, des polypeptides de fusion à partir des grains d'amidon.

18. Procédé de préparation d'un peptide d'intérêt caractérisé en ce qu'il comprend la mise en oeuvre du procédé selon la revendication 16 ou la revendication 17, ledit procédé étant effectué par transformation des cellules hôtes avec des séquences nucléotidiques selon la revendication 5, et comprend une étape supplémentaire de clivage du polypeptide de fusion obtenu, à l'aide d'un réactif approprié, puis, le cas échéant, une étape de purification du polypeptide d'intérêt.

19. Procédé de biotransformation de grains d'amidon caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- transformation de cellules végétales, à l'aide d'un hôte cellulaire, tel que *Agrobacterium tumefaciens*, transformé par un vecteur recombinant, notamment du type plasmide, cosmide ou phage, contenant une séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 4, codant des enzymes susceptibles de transformer l'amidon,

- obtention de plantes, algues ou micro-algues transformées de manière à ce que leur génome contienne une ou plusieurs séquences nucléotidiques susmentionnées, par culture *in vitro* des cellules hôtes transformées susmentionnées,

- le cas échéant, fécondation et récupération des semences des plantes obtenues à l'étape précédente, et mise en culture de ces semences pour l'obtention de plantes de génération suivante,

- extraction des grains d'amidon à partir des plantes, algues ou micro-algues, ou de parties, notamment fleurs, fruits, feuilles, tiges, racines, ou de fragments de ces plantes, algues ou micro-algues transformées susmentionnées, notamment par sédimentation,

- le cas échéant, chauffage desdits grains d'amidon à une température à laquelle le peptide d'intérêt du polypeptide de fusion est susceptible d'être actif.

1- ATTGGCACGAGTGACAGCCATGCACTACGGTACCGTGCCCGTAGCCTCCACCGGGGCCCTGGTGCACACCGTCAAGGAGGGCGTCAACGGCTTCCA
TAAGCCGTGCTCAGTGGGTACGTGATGCCATGGCACGGGCAACCATCGAGGTGGCCGGACCAGCTGTGCAGTTCTCTCCGAGTGGCCGAAGGT
S A R V H A M H Y G T V P V A S T G G L V D T V K E G V T G F H
101- CATGGCGCCCTGAACCCCGACAAGCTGGACGAGGCTGACGCCGACGCCCTGGCCGCCACCGTGCCCGTGGCAGCGAGGTGTTTGGGGCGGCGCGCTAC
GTACCCGCGGACTTGGGCTGTTGACCTGCTCCGACTGCGGCTGCGGACCGGCGGTGGCACGCGGACGGTCTCCACAAACGCCCGCGCGGCGATG
M G A L N P D K L D E A D A L A A T V R A S E V F A G G R Y
201- CCCGAGATGGTGGCCAACTGCATCAGCCAGGACTGTCTGTGTCAAAGCCCGCCAGAAAGTGGAGGGCCTGCTGGAGGAGGTGGTGTACGGCAAGGGCG
GGGCTCTACCAACCGGTTGACGTAGTCCGTCTGGACAGGACCAAGTTTCGGCGGGTCTTACCCCTCCGACGACCTCTCTCACACCATGCCGTTCCCGC
P E M V A N C I S Q D L S W S K P A Q K W E G L L E V V Y G K G G
301- GCGTGGCCACCGCCAAGAAGGAGATCAAGTGCCCGTTCGCGAGAGATCCCCGGGACCTGCCCGCGTGTCTTACGCCCCCAACACCCCTGAAGCC
CGCACCGGTGGCGGTTCTCTCTCTAGTTCCACGGGCAACGGCTCTTCTAGGGCCGCTGGACGGCGGCACAGGATCGGGGGTGTGGGACTTCCG
V A T A K K E E I K V P V A E K I P G D L P A V S Y A P N T L K P
401- CGTGTCCGCTCCGTGGAGGGCAACGGCGCGCCGCAAGTGGCAACCGCCCGCCCATGGCGCGTGGCGCGACCAACCCCTCGGGCCCC
GCACAGGGGAGGACCTCCCGTTGCCCGGGCGCGGGTTCAGCCGTGTGGCGGGCGGTACCCGCGCACCGCGCTGGTGGGGAGCCCCGGG
V S A S V E G N G A A A P K V G T A P A M G A W R A T T P S G P
501- TCGCCCGCGCGCACCCCAAGGTGACCACTACAAGCCCGCCCTGCCCGCACCGCAAGCCCAAGACCGCTGGCTCAAGCTGGCCGGTGAGGCCT
AGCGGGCGGGCGGTCCACTGGTGTGATGTTCCGGCGGACGGCGGTTCGGGTTCTGGCGACCGGAGTTCGACCGGCACTCCGGA
S P A A A T P K V T T Y K P A L P A T A K P K T A G L K L A G E A S
601- CCACCACTCGACCTCGGAGAACGGCGTCCCAACGGCAACGGTCCCTGGCCCTCCAAGACCTCGGCTGCCAAGCCCCCTGGTCTCCGCGCGG
GGTGGTGAGCTGAGCCCTCTTGCCCGCAGCGAGGTTGCCGTTGCCGACGAGCGGAGGTTCTGGAGCCGACGGTTCGGGGACCAAGAGCGCGG
T T S T S E N G A A S N G N G A S A S K T S A A K P L V S A A
701- CACCCGCAAGTCCGCCCTAAAGCGGCAAGTACCCGAGAGGGCGGACAGCATGAGCGGCTCGACCAAGCTGTGGCAGGAACGGCTGTAGCAGCGGCAGGC
GTGGCGGTTCAGCGGGATTTCGCCGTCATCGCGGCTCTCCGCGCTGTCTGTACTCGCCGAGCTGGTTTCGACACCGCTCTTGGCCGACATCGTTCGCCGTCG
T R K S A
801- GGCCGCCACCGCGGAGGACGAGCTTGCGGCACCGAGGGCGATGAGCTTAGCGGCCGTGAGCATGGCAGGCGGAAACCGTGTGTACTGAAATGTGGTGCAT
CCGCGGCTGGCGCTCCTCGTCCGAACGCCGCTCGCTCCGCTACTCGAATCGCCGCGCACTCGTACCGTCCGCCCTTTGCACACATGACTTTACACCACTGA
901- GAGAGTGTGCTGTAATGAAGTCGGTTTTCGGAGACCCGGAGAAACCGCCGGTTTGTTTTGTAGTGCAGGGCCCTGTGGTTTTCGGTTTTCGCCCAAGTCCA
CTCTCACAGCACGACATTACTTCAGCCAAACCGTCTGGCCCTCTTTGGGGCCAAACCAACATACGTCCTCCGGACACCAACCAACCGGGTTCAGGT

Figure 1 (suite 1)

1001- AAAGAAGAGTAACGAAACTGTAGCAGTAGCAGAGACCTTGCGCGGGCGCGGACGACCGCGGCCCGTGGCGAGCCCTGTCTGCCCCTCAGCCCTTGATTC
TTTCTTCTCATTTGACATCGTCACTGCTCGTGAACGCGCGCGCGCGTGGTGCGCGGCGACGCGTGGACAGGACGGGAGTCCGGAACACTAAG
1101- GCGGGCAAGAGGGCGGGTCTGTACACTCCATCCAGGATTTTGCAGGCTGCCTGAGAGTTTGCCATTTTGTGGGACGTGAGCGGGGACGGCCG
CCGCCGTTCTCCCGCCAGACATGTGAGGTAGGTAGGTCTTAAACAGTCCGACGGACTCTCAACGGTAAACACCCCTGCACCTCGCCCGCCCTGCCGGC
1201- CGCCGGGCTCTCTACCGCTCCGGCAACGGAGAGTGGGAGGCGCTGTAGCCCGGTGACCCCCCAATGTAGAGGATGGGATACATAAGAGCGTGTGAA
GCGCCCCGAGAGGATGGCGGAGGCGGTTGCCCTCTTACCCCTCCGCGACATCGGGCCACTGGGGGTTACATCTCCTACCCCTATGTATTCTCGCACACCTT
1301- TGGTGGTAAAGAGGAGGGCCCTGGGTGCCCCCTCGATGGTTTGTGTGAGGTGCAGACGGCACCGTGGCGGTCAAAGGCCCTCGCAAGGCCCGGGTGCCCT
ACCACCATTTTCTCTCTCCCGGACCCAGCGGGGAGCTACCAAAACAACCTCCAGTCTGCCGTGGCAGCCGAGTTTCCGGGAGCGTTCCGGGGCCCCACGGA
1401- TGGGCTCATTTTGGTGCCCGTCGATGATGAGAGATTGGCCAGCGGTTTGTGAGGCTGGCTCGAAGCGAGGGTTTGTGGAAGTGGAGCGGAGGGTTG
ACCCGAGTAAACACGCGGAGCTACTACTCTAAACGGTCGCCCAAAAACCTCCGACCGAGCTTCGCTCCCAACACACCTTCACCTCGCTCCTCCCCAAC
1501- GAGAAAGAGCGGACATGCTTGACTGGAGGTACACAAAGTGGAGCGTGGACGGCACGGAGGCATTTGCGGACTATTGACCCAGTAGTGTGGAAGTAGT
CTCTTTCTCCGCTGTACGAACTGACCTCCATGTGTTTACCTCGCACGCTGCCGTGCCCTCCGTAAACCGCCTGATAACTGGGTCATCACACCTTTCATCA
1601- TGGACCTGAATTTTGAGAGTACCGCGCATTAATCCGTGAGAGAGTAACAAGATGGCACCTGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA
ACCTGGACTTAAGAACTCTCATGGCGCGTAATTAGGCACTCTCTCATTTGTTTCTACCGTGGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT